

MEMORIA DESCRIPTIVA:**PROTEÍNA NMB0928 Y SU USO EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS.**

La presente invención está relacionada con la rama de la medicina, particularmente con el desarrollo de nuevas formulaciones combinadas, de aplicación preventiva o
5 terapéutica, que permitan un aumento en la calidad de la respuesta inmune contra antígenos vacunales contra enfermedades de origen diverso.

Neisseria meningitidis, un diplococo Gram negativo cuyo único hospedero es el hombre, es el agente causal de la meningitis meningocócica. Usualmente esta bacteria se encuentra en estado de portador asintomático en la población, siendo esta
10 la vía más común para su aislamiento microbiológico.

En el mundo los niños menores de 2 años de edad son la población más susceptible a contraer la meningitis meningocócica, sin embargo, los adolescentes jóvenes y la población de adultos mayores también pueden ser afectados.

La enfermedad meningocócica sin tratamiento es fatal en la mayoría de los individuos
15 afectados, y la vacunación podría prevenir esta situación evitando incluso etapas tan tempranas como la colonización bacteriana.

Diversas estrategias se han desarrollado con el objetivo de obtener un preparado vacunal que satisfaga los requisitos necesarios para proteger a la población contra esta enfermedad. Para ello se han tenido en cuenta los antígenos capsulares cuya
20 especificidad inmunológica ha permitido la clasificación de este microorganismo en serogrupos. En la actualidad se han definido 5 de estos serogrupos como los responsables de la mayoría de los casos de enfermedad meningocócica en el mundo. El serogrupo A es el principal responsable de las epidemias en África subsahariana. Los serogrupos B y C están asociados a la mayor parte de los casos que ocurren en
25 los países desarrollados. Los serogrupos Y y W135 están presentes en la mayoría de los casos remanentes de la enfermedad y de infección prevalente en algunas regiones de los Estados Unidos, con un marcado incremento en los últimos años. De ahí que los polisacáridos capsulares hayan sido objeto de estudio y evaluación como candidatos vacunales. Una vacuna tetravalente, basada en polisacáridos, que confiere
30 protección contra los serogrupos A, C, Y, y W-135 ha sido licenciada en los Estados Unidos. Los anticuerpos que son generados tras la vacunación son serogrupo-

BEST AVAILABLE COPY

específico (Rosenstein N. *et al.* 2001. *Meningococcal disease*. N. Engl. J. Med, 344, 1378-1388).

El serogrupo B, a diferencia del resto, continúa siendo una importante causa de enfermedad meningocócica endémica y epidémica, en gran parte debido a la no existencia de vacunas efectivas contra el mismo. Se ha visto que el polisacárido del serogrupo B posee una baja inmunogenicidad, además del riesgo teórico que existe de que vacunas basadas en este compuesto podrían desarrollar inmunotolerancia e inducir autoinmunidad dada su homología estructural con cadenas oligosacarídicas presentes en estructuras fetales humanas (Finne J. *et al.* 1987. *An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues*. J. Immunol, 138: 4402-4407). Por este motivo, el desarrollo de vacunas contra el serogrupo B se ha concentrado en el uso de antígenos subcapsulares.

Vacunas de vesículas y proteínas de membrana externa

En la década de los años 70 la producción de vacunas de proteínas de membrana externa (PME), estuvo basada en la eliminación del lipopolisacárido (LPS) de las preparaciones proteicas mediante la utilización de detergentes (Frasch CE and Robbins JD. 1978. *Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model*. J Exp Med 147(3):629-44). Después, las PME fueron precipitadas para producir agregados resuspendidos en cloruro de sodio. A pesar de los buenos resultados obtenidos en estudios realizados en animales, estas vacunas no indujeron anticuerpos bactericidas ni en adultos ni en niños (Zollinger WD, *et al.* 1978. *Safety and immunogenicity of a Neisseria meningitidis type 2 protein vaccine in animals and humans*. J. Infect. Dis. 137(6):728-39), resultado que fue atribuido a la desnaturalización de las proteínas presentes en la preparación como resultado de la precipitación. Los próximos pasos en la búsqueda de un nuevo candidato, fueron: diseñar una vacuna que presenta las proteínas en su conformación nativa formando vesículas de membrana externa (Zollinger WD, *et al.* 1979. *Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man*. J. Clin. Invest. 63(5):836-48, Wang LY and Frasch CE. 1984. *Development of a*

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Neisseria meningitidis group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. Infect Immun. 46(2):408–14136).

Las vacunas compuestas por vesículas de membrana externa (VME) fueron significativamente más inmunogénicas por vía parenteral que los agregados de PME, y esta inmunogenicidad fue explicada inicialmente por una mayor adsorción al adyuvante hidróxido de aluminio (Wang LY and Frasc CE. 1984. *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. Infect Immun. 46(2):408–14136).

Varios estudios de eficacia se han llevado a cabo utilizando vacunas basadas en vesículas de membrana externa, en diferentes formulaciones. Las dos vacunas más ampliamente estudiadas fueron desarrolladas en los años 80 en respuesta a brotes de la enfermedad meningocócica en Cuba (Sierra GV et al. 1991. *Vaccine against group B Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba*. NIPH Ann Dis. 14(2):195–210) y Noruega (Bjune G, et al. 1991. *Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway*. Lancet. 338(8775):1093–6), respectivamente. La vacuna producida por el Instituto Finlay en Cuba (comercialmente denominada VA-MENGOC-BC®) es producida a partir de la cepa B:4:P1.19,15 y está compuesta por una preparación de PME de dicha cepa y polisacárido capsular aislado del serogrupo C, adsorbidas a hidróxido de aluminio (Sierra GV et al. 1991. *Vaccine against group B Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba*. NIPH Ann Dis. 14(2):195–210). Esta vacuna contribuyó a un rápido descenso de la epidemia en Cuba (Rodríguez AP, et al. *The epidemiological impact of antimeningococcal B vaccination in Cuba*. 1999. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(4):433–40).

La vacuna producida por el Instituto Nacional de Salud Pública de Noruega (NIPH) fue inicialmente utilizada durante un período hiperendémico de la enfermedad causada por una cepa perteneciente al clon ET-5 (B:15:P1.7,16). Esta vacuna monovalente también fue producida a partir de VME purificadas y adsorbidas a hidróxido de aluminio (Bjune G, et al. 1991. *Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway*. Lancet. 338(8775):1093–6).

Las vacunas de VME parecen ser efectivas en la presentación de PME, dispuestas en su conformación natural, para permitir la generación de anticuerpos bactericidas, al

- menos en adolescentes y adultos. Las respuestas de anticuerpos generadas, incrementaron la opsonofagocitosis del meningococo. La formulación precisa de las vacunas (por ejemplo: contenido de PME, contenido de LPS y la presencia o ausencia del adyuvante) tiene un significativo impacto en la inmunogenicidad existiendo grandes
- 5 diferencias de un productor a otro según la cepa y/o la metodología empleada (Lehmann AK, *et al.* 1991. *Immunization against serogroup B meningococci. Opsonin response in vaccinees as measured by chemiluminescence*. APMIS. 99(8):769–72, Gomez JA, *et al.* 1998. *Effect of adjuvants in the isotypes and bactericidal activity of antibodies against the transferrin-binding proteins of Neisseria meningitidis*. Vaccine. 16(17):1633–9, Steeghs L, *et al.* 1999. *Immunogenicity of Outer Membrane Proteins in a Lipopolysaccharide-Deficient Mutant of Neisseria meningitidis: Influence of Adjuvants on the Immune Response*. Infect Immun. 67(10):4988–93).
- 10 Sin embargo, el perfil antigénico de los aislamientos obtenidos de pacientes cambia rápidamente y una vacuna abarca sólo un limitado número de cepas, por tanto puede ser inefectiva en unos años si las cepas que la componen no se corresponden con la
- 15 epidemia local existente.
- Hasta el momento, las vacunas de VME han sido más utilizadas que cualquier otra vacuna del serogrupo B y son útiles en el contexto de los brotes de la enfermedad causada por un solo tipo de cepa.
- 20 Los inmunógenos responsables de la reactividad cruzada inducida por este tipo de preparados no han sido completamente caracterizados, y muchos antígenos presentes en estos preparados restan por ser identificados. Estudios realizados con los sueros provenientes de ensayos clínicos del Instituto Finlay y el NIPH, sugieren que los anticuerpos contra la proteína de clase 1 (P1, también llamada PorA) y Opc (otra PME
- 25 mayoritaria) (Wedegge E, *et al.* 1998. *Immune Responses against Major Outer Membrane Antigens of Neisseria meningitidis in Vaccinees and Controls Who Contracted Meningococcal Disease during the Norwegian Serogroup B Protection Trial*. Infect Immun. 66(7): 3223–31), son importantes mediadores de la actividad bactericida del suero (fundamentalmente P1) y en ambas proteínas se observó una
- 30 marcada variabilidad de cepa a cepa.
- La proteína P1 es un antígeno con un significativo nivel de variabilidad, el cual parece experimentar variación continua entre y durante los brotes (Jelfs J, *et al.* 2000.

- Sequence Variation in the porA Gene of a Clone of Neisseria meningitidis during Epidemic Spread.* Clin Diagn Lab Immunol. 7(3):390–5) y hacia el cual van dirigidos predominantemente los anticuerpos bactericidas después de la vacunación (y después de la enfermedad), por lo que la protección producto de la inmunización con vacunas
- 5 de VME de una sola cepa (monovalentes), las cuales pudieran ser serosubtipo específica (por ejemplo dependientes del tipo de P1), se hace cuestionable. Para resolver este problema se desarrolló una vacuna de VME en Holanda, (RIVM) que contenía P1 de seis aislamientos patogénicos diferentes (Van Der Ley P and Poolman JT. 1992. *Construction of a multivalent meningococcal vaccine strain based on the*
- 10 *class 1 outer membrane protein.* Infect Immun. 60(8):3156–61, Claassen I, et al. 1996. *Production, characterization and control of a Neisseria meningitidis hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine.* Vaccine. 14(10):1001–8). En este caso las vesículas fueron extraídas de dos variantes de la cepa H44/76, genéticamente manipulada para expresar tres proteínas P1 independientes.
- 15 *La búsqueda de un antígeno universal*
- Aunque las proteínas de membrana externa (PME) pueden inducir una respuesta inmune funcional contra el serogrupo B, ninguna de las vacunas confiere una protección universal, debido a la gran heterogeneidad de las regiones expuestas en la superficie de las PME. La discreta reactividad cruzada inducida por las vacunas de
- 20 vesículas de membrana externa (VME) ha incentivado la búsqueda de un antígeno de membrana externa (o de un grupo de antígenos), que induzca anticuerpos funcionales y esté presente en todas las cepas del meningococo. Estos antígenos deben ser la base para una vacuna antimeningocócica realmente universal, la cual eliminará el potencial problema de la modificación capsular en las cepas patogénicas, después de
- 25 la vacunación con polisacárido.
- Debido a la variabilidad de la proteína inmunodominante P1, su uso en una vacuna universal esta limitado, y por tanto otras PME mayoritarias fueron consideradas candidatos para una vacuna y muchas de ellas se encuentran en desarrollo. Algunas de las que han sido incluidas son: proteínas de clase 5 (Opc), NspA y proteínas
- 30 reguladas por hierro (TbpA y B, FbpA y FetA). TbpB forma parte del complejo de unión de transferrina, junto con TbpA. Recientes trabajos sugieren que la TbpA tiene una función más importante en la unión al hierro (Pintor M, et al. 1998. *Analysis of TbpA*

and TbpB functionality in defective mutants of Neisseria meningitidis. J Med Microbiol 47(9): 757-60) y es un inmunogéno más efectivo que la TbpB.

- Una PME minoritaria, altamente conservada, ha sido descubierta a través de una técnica novedosa, la que consiste en emplear combinaciones de PME provenientes de
- 5 diferentes cepas para inmunizar ratones (Martin D, *et al.* 1997. *Highly Conserved Neisseria meningitidis Surface Protein Confers Protection against Experimental Infection.* J Exp Med 185 (7): 1173-83). Se utilizaron células B de ratones inmunizados para producir hibridomas, y los mAbs se examinaron para evaluar la reactividad cruzada contra múltiples cepas del meningococo. Como resultado se encontró un
- 10 anticuerpo monoclonal con reactividad cruzada que reconoció una PME de 22 kDa y fue designada como NspA. La inmunización con la proteína NspA indujo respuesta de anticuerpos bactericidas en ratones contra las cepas de los grupos A hasta C y también protege contra la infección meningocócica letal (Martin D, *et al.* 1997. *Highly Conserved Neisseria meningitidis Surface Protein Confers Protection against*
- 15 *Experimental Infection.* J Exp Med 185 (7): 1173-83). La comparación de secuencias de NspA, genéticamente divergentes, demostró que la proteína está altamente conservada (97% homología) (Cadieux N, *et al.* 1999. *Bactericidal and Cross-Protective Activities of a Monoclonal Antibody Directed against Neisseria meningitidis NspA Outer Membrane Protein.* Infect Immun 67 (9): 4955-9).
- 20 La presencia de NspA se detectó por ELISA en un 99.2% de las cepas testadas pertenecientes a los serogrupos desde la A hasta la C, utilizando anticuerpos monoclonales (Martin D, *et al.* 1997. *Highly Conserved Neisseria meningitidis Surface Protein Confers Protection against Experimental Infection.* J Exp Med 185 (7): 1173-83). Se ha comprobado que estos anticuerpos monoclonales presentan actividad
- 25 bactericida contra numerosas cepas del meningococo y son capaces de reducir la bacteriemia provocada por este microorganismo en un modelo murino (Cadieux N, *et al.* 1999. *Bactericidal and Cross-Protective Activities of a Monoclonal Antibody Directed against Neisseria meningitidis NspA Outer Membrane Protein.* Infect Immun 67 (9): 4955-9). Aunque estos resultados sugieren que la NspA es un
- 30 prometedor candidato vacunal capaz de conferir protección contra varios serogrupos, un suero policlonal de ratón contra la proteína recombinante, no se asoció a la superficie en un 35% de las cepas de meningococo del serogrupo B, a pesar de la

presencia del gen *nspA* en estos organismos (Moe GR *et al.* 1999. *Differences in Surface Expression of NspA among Neisseria meningitidis Group B Strains*. Infect Immun 67 (11): 5664-75).

Presentación de los antígenos y la formulación de la vacuna.

- 5 Los primeros trabajos sugirieron que la forma en que los antígenos eran presentados era muy importante para generar una respuesta inmune. Los epitopos presentes en las proteínas que se encuentran unidas a la membrana, en muchos casos, dependen de la correcta estructura terciaria y la misma a su vez, depende frecuentemente de los dominios hidrofóbicos unidos a la membrana. Este efecto se ha demostrado en
- 10 preparaciones de PME que resultan inmunogénicas en humanos, sólo cuando se presentan en forma de vesículas (Zollinger WD, *et al.* 1979. *Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man*. J Clin Invest 63 (5): 836-48, Zollinger WD, *et al.* 1978. *Safety and immunogenicity of a Neisseria meningitidis type 2 protein vaccine in animals and*
- 15 *humans*. J Infect Dis 137 (6): 728-39).

Durante décadas se han utilizado vacunas integradas por una sola proteína y generalmente han mostrado buena estabilidad, pero la misma puede variar si se requiere la presentación de las proteínas en forma de vesículas para lograr que los antígenos permanezcan unidos a la membrana. La inmunogenicidad y reactogenicidad

20 de las VME puede variar con alteraciones en la cantidad de proteínas y LPS eliminadas durante el proceso de purificación. La construcción de vesículas liposomales sintéticas permite la optimización y estandarización de dichas vacunas (Christodoulides M, *et al.* 1998. *Immunization with recombinant class 1 outer-membrane protein from Neisseria meningitidis: influence of liposomes and adjuvants*

25 *on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci*. Microbiology 144(Pt 11):3027-37). Es decir, las PME han sido presentadas en forma de vesículas y como proteínas expresadas con un elevado grado de pureza, y en ambos casos se ha logrado desarrollar respuesta de anticuerpos. La inyección intramuscular de la vacuna antimeningocócica

30 ha sido la vía utilizada que permite la producción de inmunoglobulina G (IgG) sistémica, aunque es importante la producción de IgA secretora, ya que durante la infección meningocócica la invasión al hospedero ocurre por la vía del epitelio nasal.

Secuenciación del genoma de N. meningitidis

La secuenciación del genoma de MC58 (una cepa de meningococo del serogrupo B) (Tettelin H, *et al.* 2000. *Complete Genome Sequence of Neisseria meningitidis Serogroup B Strain MC58*. Science 287 (5459): 1809-15172) y de Z2491 (una cepa de serogrupo A) (Parkhill J, *et al.* 2000. *Complete DNA sequence of a serogroup A strain of Neisseria meningitidis Z2491*. Nature 404 (6777):502-6173) fueron publicadas durante el año 2000. La disponibilidad de las secuencias de ADN tiene una gran influencia en la investigación de una vacuna antimeningocócica. Mientras la secuenciación del genoma de MC58 continuaba su desarrollo, Pizza y colaboradores comenzaron identificando los marcos abiertos de lectura (ORFs) que fueron predichos para codificar las proteínas expuestas en la superficie, unidas a membrana y las que se exportan. Este grupo de investigadores identificaron 570 ORFs, amplificados a través de la reacción en cadena de la polimerasa y los clonaron en *Escherichia coli*, para permitir la expresión de proteínas de fusión con cola de histidina o glutatión S-transferasa (Pizza M, *et al.* 2000. *Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing*. Science 287 (5459): 1816-20). El 61% (350) de los ORFs seleccionados fueron expresados exitosamente, en la mayoría de los casos aquellos que no lograron expresarse, tenían más de un dominio hidrofóbico de transmembrana. Las proteínas recombinantes fueron purificadas y se utilizaron para inmunizar ratones. Los sueros obtenidos fueron evaluados por ELISA, citometría de flujo y se les determinó la actividad bactericida contra 2 cepas. Posteriormente se seleccionaron 7 proteínas que en los 3 ensayos resultaron positivas. Las formulaciones vacunales empleando algunas de estas proteínas combinadas con adyuvantes, indujeron títulos significativos de anticuerpos bactericidas contra la cepa homóloga (MC58), pero ninguno de ellos fue tan alto como los inducidos por una vacuna de VME de esta misma cepa (Giuliani MM, *et al.* 2000. Proceedings 12th IPNC. p. 22). Por otro lado, existen evidencias de que combinaciones de estas proteínas resultan más inmunogénicas que cada proteína por separado (Santini L. *et al.* 2000. Proceedings 12th IPNC. p. 25). Los numerosos ORFs excluidos en ese trabajo, quizás por la falta de la expresión proteica o por modificaciones de las propiedades inmunológicas, necesitan una investigación más profunda.

Los componentes de una vacuna deben seleccionarse en base a la contribución de los antígenos en la patogénesis de *N. meningitidis*. Los antígenos por sí solos pueden ser efectivos candidatos vacunales, o alternativamente, los mutantes atenuados pueden ser considerados integrantes de una vacuna.

- 5 En este sentido, el empleo de candidatos cuya secuencia esté altamente conservada incluso entre diferentes géneros de microorganismos patógenos, podría resultar una solución a las afectaciones producidas por los mismos en caso de que generen una conveniente respuesta por parte del sistema inmune.

- El objetivo técnico que se persigue con esta invención es precisamente el desarrollo
10 de formulaciones capaces de elevar y/o ampliar la respuesta inmune del organismo contra varios patógenos o contra un espectro amplio de variedades del mismo, siendo estos patógenos de carácter parasitario, bacteriano, viral, canceroso u otro.

Descripción detallada de la invención

- 15 En el trabajo objeto de la presente invención se reporta por primera vez el uso de la proteína NMB0928 como componente de una formulación vacunal de carácter terapéutico o preventivo contra la enfermedad meningocócica o de cualquier infección provocada por un miembro del género *Neisseria*.

- El carácter novedoso de esta invención reside en el uso, previamente no reportado, de
20 la proteína NMB0928 en formulaciones con nuevas propiedades, capaces de inducir una respuesta inmune sistémica y mucosal de amplio espectro protector, dado el carácter conservado de esta proteína en diferentes aislamientos de *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

25 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Vector pM100 empleado en el clonaje y la expresión de la proteína NMB0928. pTrip, promotor triptófano; N-term P64k, fragmento N-terminal de la P64k; T4 Terminator, terminador de la transcripción del bacteriófago T4.

30

Figura 2. Construcción final obtenida del clonaje de la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *NMB0928* en el vector pM100.

Figura 3. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la ruptura celular; carril 1, sobrenadante de ruptura; carril 2, precipitado de ruptura.

5 **Figura 4.** Análisis mediante SDS-PAGE del proceso de solubilización de la proteína NMB0928 a partir del precipitado de ruptura: (A) carril 1, precipitado de ruptura; carril 2, precipitado del lavado con solución tampón TE1X que contiene urea 3M ; carril 3, fracción soluble del lavado; (B) carril 1, sobrenadante de solubilización con solución tampón TE1X que contiene urea 6M; carril 2, precipitado de solubilización.

10

Figura 5. Niveles de anticuerpos (IgG) contra la proteína recombinante NMB0928, obtenidos al inmunizar ratones con el mismo antígeno por vía intranasal o intraperitoneal. Se representan los resultados obtenidos en un ensayo tipo ELISA, que fueron expresados como el inverso del título, calculado como la dilución de la muestra
15 donde se duplica la densidad óptica de la muestra preinmune.

Figura 6. Reconocimiento por *Western blotting* de la proteína NMB0928 presente en las PME de *N. meningitidis* utilizando sueros de ratones inmunizados con la proteína recombinante: La flecha indica la banda correspondiente a la proteína NMB0928
20 inmunoidentificada.

Figura 7. Respuesta de anticuerpos IgA contra la proteína recombinante NMB0928, a nivel mucosal, en ratones inmunizados con el antígeno por vía intranasal. Los resultados se expresan como el inverso del título, calculado como aquella dilución de
25 la muestra donde se duplica la densidad óptica de la muestra preinmune. (A) Respuesta de anticuerpos IgA en saliva. (B) Respuesta de anticuerpos IgA en lavados pulmonares

Figura 8. Resultados de la búsqueda de similitud entre el gen NMB0928 ("query") y las secuencias anotadas de los genomas de diferentes serogrupos de *Neisseria meningitidis* ("Sbjct") empleando el programa BLAST.
30

Figura 9. Reconocimiento de la proteína NMB0928 en diferentes cepas de *N. meningitidis*, por sueros producidos contra el antígeno recombinante. En el gráfico sólo se muestran los valores obtenidos cuando se inmunizó con la proteína semipurificada por vía intraperitoneal, aunque en el resto de los casos se observó un comportamiento similar. Los resultados fueron expresados como el inverso del título, calculado como la dilución del suero donde se duplica la densidad óptica del suero preinmune.

Figura 10. Comparación entre los sueros obtenidos inmunizando con la proteína obtenida por dos procedimientos, administrada por vía intraperitoneal, en el experimento de protección pasiva contra infección meningocócica, en el modelo de rata infante.

Figura 11: Reconocimiento de la proteína NMB0928, y de un panel de antígenos no relacionados, por los mAbs generados (mAbs E45-8-15, 2G23-12). P1, proteína de clase 1 de *Neisseria meningitidis* cepa B:4:P1.15; P64k, subunidad E3 de la enzima piruvato deshidrogenasa de *Neisseria meningitidis*; T.T, toxoide tetánico; HBsAg, antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B.

Figura 12. Reconocimiento de la proteína NMB0928 por sueros de pacientes convalecientes de la enfermedad meningocócica. Como control negativo se emplearon sueros de donantes sanos. Los resultados se representan como la absorbancia (492nm) en un ensayo tipo ELISA.

Figura 13. Títulos de anticuerpos anti-péptido JY1 correspondientes a los sueros de los animales inmunizados con el péptido libre (JY1), la proteína recombinante (NMB0928) y el conjugado JY1-NMB0928.

Ejemplos.

Ejemplo 1

Detección de la proteína NMB0928 en preparaciones de vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis*, serogrupo B.

Con el objetivo de estudiar las proteínas presentes en preparaciones de vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (cepa B:4:P1.19,15), se realizó una electroforesis bidimensional según lo descrito en la literatura (Görg A,

et.al. 1985. Electrophoresis 6:599-604). A continuación se realizó una digestión enzimática de las proteínas extraídas del gel empleando la enzima tripsina (Promega ,Madison, WI, E.U). Los péptidos generados durante la digestión fueron extraídos de la solución empleando microcolumnas (ZipTips, Millipore, MA, E.U). Previo al análisis por
5 espectrometría de masas los péptidos fueron eluidos de las microcolumnas con solución de acetonitrilo al 60% y 1% de ácido fórmico e inmediatamente la mezcla se cargó en nanoagujas (Protana, Dinamarca).

Las mediciones se realizaron en un espectrómetro de masas híbrido con cuadrupolo y tiempo de vuelo (QTof-2™ ,Manchester, Reino Unido), equipado con una fuente de
10 ionización (nanoESI). Los espectros de masas fueron adquiridos en un rango de m/z desde 400 hasta 2000 en 0.98 segundos y utilizando 0.02 segundos entre cada uno de los barridos. La adquisición y procesamiento de los datos fue realizada a través del programa MassLynx (versión 3.5, Micromass).

La identificación de proteínas basada en los espectros ESI-MS se realizó empleando
15 el programa ProFound (Zhang W and Chait BT. 2000. *ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information*. Anal Chem 72:2482-2489. <http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>). La búsqueda se suscribió a las secuencias de genes y proteínas de bacterias contenidas en las bases de datos SwissProt (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>) y NCBI
20 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), considerando la oxidación de metioninas, la desamidación y la carboxiamidometilación de cisteínas como posibles modificaciones presentes.

La identificación de las proteínas basada en los espectros MS/MS se realizó a través del programa MASCOT (Perkins DN, *et al.* 1999. *Probability-based protein
25 identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis 20:3551-3567. <http://www.matrixscience.com/>). Entre los parámetros de búsqueda se incluyó la modificación de cisteínas así como las posibles oxidaciones y desamidaciones.

A partir del análisis de los datos obtenidos de la identificación de las proteínas
30 presentes en preparaciones de vesículas de membrana externa se seleccionó para evaluar como posible candidato vacunal a la proteína NMB0928, de la cual fue identificado mediante espectrometría de masas 1 péptido.

Ejemplo 2

Identificación del producto del gen nmb0928 como la lipoproteína-34 de *Neisseria meningitidis*

- 5 Para la identificación de la proteína NMB0928, se realizó una búsqueda de similitud de secuencias en la base de datos del NCBI empleando el programa BLAST (Altschul SF, *et al.* 1990. *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol 215:403-410, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los resultados de este procedimiento indicaron homología, además de con las correspondientes proteínas de otros serogrupos de
- 10 *Neisseria*, con las de varios microorganismos entre las cuales se encuentra la lipoproteína-34 codificada por el gen nlpB de *Escherichia coli*, identificada en el año 1991 la cual se demostró que se fracciona en los proteoliposomas de membrana externa (Bouvier J, Pugsley A.P and Stragier, P. 1991. *A gene for new lipoprotein in the dapA-purC interval of the E. coli chromosome*. J Bacteriol 173(17):5523-31)
- 15 La conservación de esta proteína en el genoma de varios géneros microbianos, ha dado lugar a que se reúnan como grupo de proteínas ortólogas en un dominio conservado reportado en la NCBI [gnl|CDD|12651, COG3317, NlpB, Uncharacterized lipoprotein (Cell envelope biogenesis, outer membrana)], lo cual indica un común ancestro filogenético para todas ellas.
- 20 El análisis de la vecindad de estos genes empleando la base de datos MBGD (Uchiyama, I. 2003. *MBGD: microbial genome database for comparative analysis*. Nucleic Acids Res. 31, 58-62.), reveló una significativa similitud en la organización génica, por lo que se identificó a la proteína NMB0928 como la lipoproteína-34 (NlpB) de *Neisseria meningitidis*.

25 Ejemplo 3

Clonaje y expresión del gen *NMB0928*, codificante para la proteína NMB0928 de *N. meningitidis* en *Escherichia coli*.

- Para realizar el clonaje y la expresión del gen NMB0928 se utilizó el vector pM-100, dicho vector permite realizar el clonaje empleando diferentes enzimas de restricción, y
- 30 obtener elevados niveles de expresión de proteínas heterólogas en forma de cuerpos de inclusión citoplasmáticos en *E. coli*.

El vector pM-100 (Figura 1) cuenta con los siguientes elementos principales: promotor triptófano, secuencia correspondiente al segmento estabilizador N-terminal del antígeno P64k de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.19,15 codificante para 47 a.a, secuencia correspondiente al terminador de la transcripción del bacteriófago T4 y secuencia
5 correspondiente al gen que confiere resistencia a ampicilina como marcador de selección.

A partir de la secuencia nucleotídica correspondiente al gen que codifica para la proteína NMB0928 (Ejemplo 1) se procedió a diseñar un par de oligonucleótidos (7740 y 7741) para amplificar el segmento de dicho gen sin la secuencia que codifica para el péptido
10 señal, utilizando el ADN genómico de la cepa B:4:P1.19,15.

BglII

7740: 5' GCAGATCCTTGGCAGCAAAACCGAAC 3'
(No. Identificación de secuencia: 1)

15

EcoRV

7741: 5' ATGGATATCCTCAGCTCGAGATGGAG 3'
(No. Identificación de secuencia: 2)

20

Para la predicción del péptido señal se utilizaron los métodos descritos en el SignalP World Wide Web server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0>).

A continuación de la amplificación del gen de la proteína NMB0928 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (Randall K, *et al.* 1988. Science 42394:487-491) utilizando los oligonucleótidos 7740 y 7741, se digirió dicho producto de RCP empleando las enzimas BglII y EcoRV, y se clonó en el vector pM-100
5 digerido previamente de la misma forma. La construcción final obtenida se muestra en la Figura 2, la proteína NMB0928 se expresa fusionada con el segmento N-terminal de la P64k. La secuenciación del segmento del gen NMB0928 clonado se realizó empleando el secuenciador automático ALFexpressII (Termo Sequenase™ Cy™ 5 Dye Terminador Kit, Amersham Biosciences) y los oligonucleótidos 1573 (No. Identificación
10 de secuencia: 8) y 6795 (No. Identificación de secuencia: 9), que hibridan en la secuencia correspondiente al segmento estabilizador de la P64k y en el terminador de la transcripción del bacteriófago T4, respectivamente. El plasmidio obtenido se nombró pM-242 para su posterior utilización.

Para la expresión del gen NMB0928 se transformó por el método químico la cepa de
15 *E. coli* GC 366 con el plasmidio pM-242 (Figura 2). El experimento de expresión se realizó en medio mínimo salino M9 (Miller JH. 1972. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NEW York, USA) suplementado con glicerol al 1%, hidrolizado de caseína al 1%, CaCl₂ 0.1 mM, MgSO₄ 1mM y ampicilina 50 ug/mL. Los cultivos se incubaron durante 12 h a 37°C a 250 r.p.m. Al cabo de este tiempo se
20 centrifugaron y se realizó la ruptura del precipitado celular mediante disrupción sónica (IKA LABORTECHNIK). Fracciones de sobrenadante y precipitado obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli UK. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 277:680) y tinción con Azul Brillante de Coomassie R-
25 250; analizándose el porcentaje de expresión mediante densitometría del gel (LKB Bromma 2202 Ultrascan laser densitometer; Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido). La proteína NMB0928 se obtuvo en el precipitado de ruptura, representando un 60% del total de las proteínas presentes en esta fracción (Figura 3). A continuación el precipitado se lavó con una solución tampón TE 1X (Tris-hidroximetil amino metano
30 10mM, ácido etilendiamino tetracético 1mM, pH 8) que contiene urea 2M con lo cual algunos contaminantes pasaron al sobrenadante en tanto la proteína de interés permanecía en el precipitado (Fig 4A). Luego dicho precipitado se solubilizó con una

solución tampón TE1X que contenía urea 6M, pasando la proteína NMB0928 a la fracción soluble que se dializó contra una solución tampón TE1X obteniéndose finalmente con un 70% de pureza como se puede observar en la Figura 4B.

5 Ejemplo 4

Evaluación de la respuesta inmune inducida por la proteína NMB0928 por vía intraperitoneal e intranasal.

Para evaluar la inmunogenicidad de la proteína NMB0928, se diseñó un esquema de inmunización en ratones, en el que se administró la misma proteína obtenida por dos
10 métodos diferentes. El primero consistió en extraer la banda de un gel de poliacrilamida (Castellanos L, *et al.* 1996. *A procedure for protein elution from reverse-stained polyacrylamide gels applicable at the low picomole level: An alternative route to the preparation of low abundance proteins for microanalysis.* *Electrophoresis* 17: 1564-1572) y el segundo se refirió en el Ejemplo 3, cuyo producto se denotó como proteína
15 semipurificada.

Con estas preparaciones se inmunizaron ratones Balb/c hembras, de 8 a 10 semanas de edad, los cuales fueron divididos en 4 grupos de 8 ratones cada uno. Se realizaron 3 inmunizaciones por vía intranasal o intraperitoneal, separadas por un intervalo de 15 días. La proteína administrada por vía intraperitoneal fue mezclada con adyuvante de
20 Freund. En la Tabla 1 se describe la composición de los grupos:

Grupos	Prot. extraída del gel	Prot. semipurificada	Ruta
1	50µg	--	i.n
2	--	50µg	i.n
3	10µg	--	i.p
4	--	10µg	i.p

Tabla1: Grupos de ratones utilizados para la inmunización

25 Los títulos de anticuerpos (IgG), contra la proteína recombinante y la proteína homóloga presente en la bacteria se determinaron mediante un ensayo tipo ELISA en sueros obtenidos después de la tercera inoculación En la Figura 5 se muestran los

títulos de anticuerpos de cada uno de los animales contra la proteína recombinante. Después de la segunda inoculación se detectan niveles de anticuerpos, aunque fueron superiores luego de la tercera inoculación. También se realizó la identificación inmunológica por *Western blotting*, detectándose el reconocimiento de la banda correspondiente a la proteína. Los grupos inmunizados por vía intraperitoneal presentaron títulos de anticuerpos significativamente superiores a los grupos inoculados por vía intranasal. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el método no paramétrico de análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, debido a que las varianzas entre los grupos no eran homogéneas según la Prueba de Bartlett. En la comparación de las medias de los tratamientos, en las combinaciones necesarias, se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn.

Los sueros obtenidos después de inmunizar con la proteína recombinante reconocieron a la proteína natural presente en un preparado de proteínas de membrana externa (PME) de la cepa CU385. Estos resultados son expuestos en la Figura 6.

Para analizar la respuesta a nivel mucosal se evaluaron muestras de saliva y lavados pulmonares. En la Figura 7 sólo se muestran los grupos inmunizados por vía intranasal y se observa un incremento en el título de IgA en el grupo al cual se le administró la proteína semipurificada.

Ejemplo 5

Caracterización de la secuencia del gen codificante para la proteína NMB0928 en distintas cepas de *N. meningitidis*.

Para analizar la conservación de la secuencia del gen codificante para la proteína NMB0928 en las especies patógenas del género *Neisseria* se realizó una búsqueda de similitud con los genomas de *Neisseria meningitidis* (serogrupos A, B y C) y *Neisseria gonorrhoeae* anotados en la base de datos del NCBI (NC 003116.1, NC 003112.1, NC 003221, NC 002946 SANGER 135720|Contig1) empleando el programa BLAST (Altschul SF, et al. 1990. *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol 215:403-410. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La Figura 8 muestra los resultados de la comparación de secuencias para aquellas secuencias que producen

un alineamiento significativo en cada uno de los genomas analizados. Dichas secuencias presentan un 98% de identidad en los serogrupos A y C, un 99% de identidad en el serogrupo B y un 96% de identidad con *Neisseria gonorrhoeae*, con la secuencia obtenida del gen que codifica para la proteína NMB0928 (No. Identificación de secuencia: 3). Adicionalmente se determinó la secuencia nucleotídica del gen en cuestión para 3 aislamientos cubanos (No. Identificación de secuencia: 5-7) pertenecientes al serogrupo B (B:4:P1.19,15) y se realizó un alineamiento de secuencia empleando el programa ClustalX (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Los resultados del alineamiento evidencian que existe una gran conservación en la secuencia nucleotídica del gen NMB0928 entre las distintas cepas analizadas. El empleo de la proteína NMB0928 como candidato vacunal, tomando en cuenta el alto grado de similitud existente entre las secuencias anteriormente citadas, permitiría generar una respuesta inmune efectiva, y de amplio espectro de protección (producto de la reactividad cruzada), contra la enfermedad meningocócica.

15

Ejemplo 6

Caracterización de la respuesta inmune de amplio espectro de acción inducida por la inmunización de ratones Balb/c con la proteína NMB0928.

Con el objetivo de evaluar si la inmunización con la proteína NMB0928 induce una respuesta de amplia reactividad cruzada con otras cepas de *Neisseria*, se realizó un ensayo tipo ELISA en el que las placas de poliestireno se recubrieron con células totales de 7 cepas de *Neisseria* pertenecientes a diferentes serotipos y serosubtipos. Las placas se incubaron con la mezcla de los sueros obtenidos contra la proteína NMB0928 por dos rutas de inmunización, según se describe en el Ejemplo 4. En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos con los sueros producidos contra la proteína semipurificada administrada por la ruta intraperitoneal. Como se observa los sueros inmunes reconocieron la proteína presente en diferentes cepas, con niveles semejantes al encontrado en la cepa CU385. El resto de los sueros tuvieron un comportamiento similar en este ensayo.

30

Ejemplo 7

Protección inducida por los sueros murinos generados contra la proteína NMB0928, contra cepas homólogas y heterólogas, en el modelo de rata infante

Para determinar la actividad funcional de los antisueros obtenidos, se realizó un ensayo de protección en el modelo de infección meningocócica en ratas infantes. En
5 dicho ensayo se emplearon 24 ratas de 5 a 6 días de nacidas, divididas en grupos de 6 animales cada uno.

Se determinó si los sueros que se administraron por la ruta intraperitoneal protegían a las ratas de la infección por la bacteria (cepa CU385), inoculada por la misma ruta una hora después. Los sueros de cada grupo de ratones inmunizados se mezclaron antes
10 de ser inoculados en ratas infantes y se diluyeron 1/10 en PBS estéril. Cuatro horas después del reto, los animales se sacrificaron y se hizo un conteo de las bacterias viables en la sangre.

Para la interpretación de los resultados se realizó un Análisis de Varianza (Anova) seguido de un análisis de comparación múltiple de Dunnet, donde se comparan los
15 grupos en estudio con el control negativo. Como se observa en la Figura 10 los grupos que recibieron los antisueros contra la proteína NMB0928 mostraron diferencias significativas respecto al control negativo, o sea fueron protectores en este modelo.

Un ensayo similar fue realizado infectando las ratas infantes con las cepas M982 y 120/90, aisladas de pacientes en Cuba, cuya clasificación serológica es homóloga a la
20 cepa B385. Además, se realizaron experimentos de reto con las cepas 233 (C:2a: P1.5) del serogrupo C y la cepa H44/76 (B:15,P1.7,16) del serogrupo B. En todos los casos los antisueros protegieron a las ratas infantes contra la infección meningocócica.

25 Ejemplo 8

Generación de anticuerpos monoclonales contra la proteína NMB0928 capaces de mediar actividad bactericida contra *Neisseria meningitidis*

Con el objetivo de generar anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos contra la proteína NMB0928, y estudiar su capacidad funcional de mediar actividad bactericida
30 contra cepas homólogas y heterólogas de *N. meningitidis*, se empleó en un esquema de inmunización una preparación de la proteína NMB0928 con un porcentaje de pureza superior al 70% (Ejemplo 3). El esquema de inmunización se realizó en ratones Balb/c

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(H-2^d, sexo femenino, 5-6 semanas) y contó con un total de 4 dosis distribuidas de la siguiente manera: los días 0, 15 y 30 del esquema 10 µg del antígeno NMB0928 por ratón (volumen total 100 µl), administrados por vía subcutánea, emulsificada la primera dosis en Adyuvante Completo de Freund, y las restantes dosis con Adyuvante Incompleto de Freund; día 50, 10 µg del antígeno por ratón en solución tampón fosfato (NaCl 140 mM, KCl 270 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ x 2H₂O 6.5 mM, pH 7.2) por vía intraperitoneal. Las extracciones se realizaron los días 0 y 45 del esquema.

Los esplenocitos del animal de mejor título, evaluados mediante un ELISA indirecto empleando la proteína NMB0928 (Ejemplo 3) en el recubrimiento, se fundieron con las células de mieloma X63 Ag8 653 y los hibridomas resultantes se aislaron y pesquisarón según métodos establecidos (Gavilondo JV. 1995. Anticuerpos Monoclonales: Teoría y Práctica, Elfos Scientiae, La Habana, Cuba).

La reactividad de los anticuerpos secretados por los hibridomas obtenidos contra la proteína NMB0928, así como su reactividad cruzada contra un grupo de antígenos no relacionados, se evaluó mediante un ELISA indirecto empleando en el recubrimiento 5 µg/ml de cada uno de los antígenos, e igual concentración de cada uno de los mAbs a ensayar. La Figura 11 muestra los resultados obtenidos en este experimento, en total se obtuvieron 2 clones positivos (mAbs E45-8-15 y 2G23-12) que reconocen específicamente la proteína NMB0928, y no a la secuencia aminoacídica correspondiente al segmento N-term de la P64k, tampoco al resto del panel de antígenos no relacionados ensayados.

Para determinar la capacidad de los mAbs generados contra la proteína NMB0928 de mediar respuesta bactericida contra cepas homólogas y heterólogas de *Neisseria meningitidis* se realizó un ensayo bactericida. El título de anticuerpos bactericidas fue expresado como el recíproco de la mayor dilución de anticuerpos evaluada, capaz de matar el 50% ó más de las bacterias; el mAb 2G23-12 tuvo títulos bactericidas superiores a 1: 128 contra la cepa homóloga B:4:P1.19,15 y superiores a 1:64 contra las cepas heterólogas B:15:P1.7,16 y C:2a:P1.5.

30 Ejemplo 9

Caracterización de las regiones blanco de la respuesta inmune murina contra la proteína NMB0928

Con el objetivo de identificar las regiones dentro de la proteína, que son más reconocidas por los antisueros murinos generados contra el antígeno recombinante se realizó un ensayo de tipo SPOTScan. Una serie de péptidos sobrelapados que cubren la secuencia de la proteína se sintetizaron sobre un soporte de celulosa y la

5 membrana se incubó con una mezcla de sueros diluída 1:100. La reacción antígeno-anticuerpo se detectó mediante la incubación con un conjugado anti-Inmunoglobulina G murina- fosfatasa alcalina, seguido de la adición de una solución que contenía el sustrato Bromo-Cloro-Indolil-Fosfato.

Se observaron varias regiones antigénicas comunes presentes en la proteína, con

10 independencia de la preparación que se empleó en la inmunización. No obstante, se apreció que en los grupos inmunizados con proteína adyuvada con Adyuvante de Freund se obtuvo un patrón de reconocimiento mucho más amplio.

Ejemplo 10

15 Reconocimiento de la proteína NMB0928 por sueros humanos.

Una batería de sueros humanos, provenientes de individuos convalecientes se empleó en este estudio, que se realizó en un ensayo tipo ELISA. Las placas se recubrieron con la proteína NMB0928 obtenida mediante electroforesis preparativa (5 µg/ml). Después de bloquear las placas con leche descremada en polvo al 3% en PBS con

20 Tween-20, los sueros se diluyeron (1:50) en la misma solución y se incubaron en las placas. El inmunoensayo prosiguió como ha sido ampliamente reportado. Como control negativo se emplearon sueros de donantes sanos. También se empleó como control no relacionado una mezcla de sueros de vacunados con vacuna recombinante contra la Hepatitis B (datos no mostrados).

25 La Figura 12 muestra los resultados obtenidos con 5 sueros de convalecientes en este ensayo. Como se aprecia, los sueros humanos reconocieron la proteína lo que indica que la misma se expresa durante la infección meningocócica y que es inmunogénica.

Ejemplo 11

30 Proteína NMB0928 como portadora de un péptido.

Para demostrar la capacidad portadora de la proteína recombinante NMB0928, se conjugó a la misma un péptido sintético de 15 residuos aminoacídicos, derivado de la

THIS PAGE BLANK (USPTO)

región V3 de la proteína gp120 del VIH-1, aislamiento JY1. La conjugación se realizó por el método del glutaraldehído. El péptido JY1 libre, la proteína recombinante NMB0928 y el conjugado JY1-NMB0928, se administró a ratones adultos en un esquema de 3 dosis, donde los inmunógenos se emulsificaron con Adyuvante de Freund. Dos semanas después de la tercera dosis se obtuvieron muestras del suero de los animales inmunizados, los que se analizaron por ELISA para determinar los niveles de anticuerpos anti-péptido. Para ello las placas se recubrieron con el péptido libre (20µg/ml) y el inmunoensayo prosiguió como se ha descrito previamente. Los resultados del experimento (Figura 13) evidencian la capacidad portadora de la proteína NMB0928, capaz de potenciar significativamente la respuesta de anticuerpos contra el péptido JY1, tras su conjugación al mismo.

15

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
- 5 <120> PROTEÍNA NMB0928 Y SU USO EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS
- <130> NMB0928
- 10 <140>
<141>
- <160> 9
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 32
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <400> 1
gcagatcttg gcagcaaac cgaac 25
- 25 <210> 2
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <400> 2
atggatatcc tcagctcgga atggag 26
- <210> 3
- 35 <211> 1197
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis
- <400> 3
- 40 atgccgtccg aaccgttcgg acggcataac gcaacaaaca cttaatatc catcacacag 60
gatgacacga tgacccatat caaaccctgc attgccgcgc tcgcactcat cgggcttgcc 120
gcctgctccg gcagcaaac cgaacagccc aagctcgact accaaagccg gtcgcaccgc 180
ctgatcaaac ttgaagtccc acctgattg aacaaccctg accaaggcaa cctctaccgc 240
ctgcctgccg gtccggggcg cgtccgcgcc agcgatttg aaaaacgccg cacaccgcc 300
- 45 gtccaacagc ctgccgatgc cgaagtattg aaaagcgtca aagggtgccg cctcgagcgc 360
gacggcagcc aacgctggct cgtgtcgcac ggcaagtctc ctgccgaaat ctggccgctc 420
ctgaaagcct ttggcagga aaacggctc gacatcaaat ccgaagaacc cgccatcgga 480
caaatggaaa ccgagtgggc ggaaaaccgc gccaaaatcc cccaagacag cttgcgccgc 540

ctcttcgaca aagtcggcgtt gggcggcatc tactccaccg gcgagcgaga caaattcatc 600
gtccgtatcg aacagggcaa aaacggcgtt tccgacatct tcttcgcca caaagccatg 660
aaagaagtgt acggcggcaa agacaaagac acgaccgtat ggcagccctc cccgtccgat 720
5 cccaacctcg aagccgcttt cctgacgcgc ttatgcaat attgggcgt tgacggacag 780
caggcggaaa acgcatcggc aaaaaaacct acccttccg ccgccaacga aatggcgct 840
atcgaaggca aaagcctgat tgtcttggc gactacggca gaaactggcg gcgcaccgtg 900
ctcgccctcg accgcatcgg gctgaccgtc gtcggcctc acaccgaac ccacgccttc 960
ctggttcaaa aagccccgaa cgaaagcaat gcagttaccg acaaaaaacc cggcctgttc 1020
10 aaacgcctgc tgggcaaagg caaagcggag aaacctgccg aacagccgga actgattgtc 1080
tatgcagaac ctgtcgccaa cggctcgcgc atcgtcctgc tcaacaaga cggcagcgca 1140
tatgccggca aagacgcac cgcattattg ggcaaacctc attccgaact gcgttaa 1197

<210> 4

15 <211> 357

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 4

20 Cys Ser Gly Ser Lys Thr Glu Gln Pro Lys Leu Asp Tyr Gln Ser Arg
1 5 10 15

Ser His Arg Leu Ile Lys Leu Glu Val Pro Pro Asp Leu Asn Asn Pro
20 25 30

25 Asp Gln Gly Asn Leu Tyr Arg Leu Pro Ala Gly Ser Gly Ala Val Arg
35 40 45

30 Ala Ser Asp Leu Glu Lys Arg Arg Thr Pro Ala Val Gln Gln Pro Ala
50 55 60

Asp Ala Glu Val Leu Lys Ser Val Lys Gly Val Arg Leu Glu Arg Asp
65 70 75 80

35 Gly Ser Gln Arg Trp Leu Val Val Asp Gly Lys Ser Pro Ala Glu Ile
85 90 95

Trp Pro Leu Leu Lys Ala Phe Trp Gln Glu Asn Gly Phe Asp Ile Lys
100 105 110

40 Ser Glu Glu Pro Ala Ile Gly Gln Met Glu Thr Glu Trp Ala Glu Asn
115 120 125

45 Arg Ala Lys Ile Pro Gln Asp Ser Leu Arg Arg Leu Phe Asp Lys Val
130 135 140

Gly Leu Gly Gly Ile Tyr Ser Thr Gly Glu Arg Asp Lys Phe Ile Val
145 150 155 160

Arg Ile Glu Gln Gly Lys Asn Gly Val Ser Asp Ile Phe Phe Ala His
 165 170 175
 5 Lys Ala Met Lys Glu Val Tyr Gly Gly Lys Asp Lys Asp Thr Thr Val
 180 185 190
 Trp Gln Pro Ser Pro Ser Asp Pro Asn Leu Glu Ala Ala Phe Leu Thr
 195 200 205
 10 Arg Phe Met Gln Tyr Leu Gly Val Asp Gly Gln Gln Ala Glu Asn Ala
 210 215 220
 Ser Ala Lys Lys Pro Thr Leu Pro Ala Ala Asn Glu Met Ala Arg Ile
 15 225 230 235 240
 Glu Gly Lys Ser Leu Ile Val Phe Gly Asp Tyr Gly Arg Asn Trp Arg
 245 250 255
 20 Arg Thr Val Leu Ala Leu Asp Arg Ile Gly Leu Thr Val Val Gly Gln
 260 265 270
 Asn Thr Glu Arg His Ala Phe Leu Val Gln Lys Ala Pro Asn Glu Ser
 275 280 285
 25 Asn Ala Val Thr Glu Gln Lys Pro Gly Leu Phe Lys Arg Leu Leu Gly
 290 295 300
 Lys Gly Lys Ala Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Glu Leu Ile Val Tyr
 30 305 310 315 320
 Ala Glu Pro Val Ala Asn Gly Ser Arg Ile Val Leu Leu Asn Lys Asp
 325 330 335
 35 Gly Ser Ala Tyr Ala Gly Lys Asp Ala Ser Ala Leu Leu Gly Lys Leu
 340 345 350
 His Ser Glu Leu Arg
 355
 40

<210> 5

<211> 1058

<212> ADN

45 <213> Neisseria meningitidis

<400> 5

ggcagcaaaa ccgaacagcc caagctcgac taccaaagcc ggtagcaccg cctgatcaaa 60

	cttgaagtcc	cacctgattt	gaacaacccc	gaccaaggca	acctctaccg	cctgcctgcc	120
	ggttcgggcg	ccgtccgcgc	cagcaatttg	gaaaaacgcc	gcacacccac	cgtccaacag	180
	cctgccgatg	ccgaagtatt	gaaaagcgtc	aaaggtgtcc	gcctcgagcg	cgacggcagc	240
5	caacgctggc	tcgttgtcga	cggcaagtct	cctgccgaaa	tctggccgct	cctgaaagcc	300
	ttttggcagg	aaaacggctt	cgacatcaaa	tccgaagaac	ccgccatcgg	acaaaaggaa	360
	accgagtggg	cggaaaaccg	cgccaaaatc	ccccaaagaca	gcttgcgccg	cctcttcgac	420
	aaagtcggct	tggggcgcat	ctactccacc	ggcgagcgcg	acaaattcat	cgtccgtatc	480
	gaacagggca	aaaacggcgt	ttccgacatc	ttcttcgccc	acaaagccat	gaaagaagtg	540
10	tacggcgcca	aagacaaaga	cacgaccgta	tggcagccct	ccccgtccga	tcccaacctc	600
	gaagccgctt	tcctgacgcg	ctttatgcaa	tatttgggcg	ttgacggaca	gcaggcggaa	660
	aacgcatcgg	caaaaaaacc	tacccttccc	gccgccaaacg	aaatggcgcg	tatcgaaagc	720
	aaaagcctga	ttgtcttttg	cgactacggc	agaaactggc	ggcgacacgt	gctcgccctc	780
	gaccgcatcg	ggctgaccgt	cgtcgggtcaa	aacaccgaac	gccacgcctt	cctgggtcaa	840
15	aaagccccga	acgaaagcaa	tgcagttacc	gaacaaaaaac	ccggcctgtt	caaacgcctg	900
	ctgggcaaaag	gcaaagcgga	gaaacctgcc	gaacagccgg	aactgattgt	ctatgcagaa	960
	cctgtcgcca	acgggtcgcg	catcgtcctg	ctcaacaaag	acggcagcgc	atatgccggc	1020
	aaagacgcat	ccgcattatt	gggcaaaactc	cattccga			1058
20	<210> 6						
	<211> 1058						
	<212> ADN						
	<213> Neisseria meningitidis						
25	<400> 6						
	ggcagcaaaa	ccgaacagcc	caagctcgac	taccaaaagcc	ggtcgcaccg	cctgatcaaa	60
	cttgaagtcc	cacctgattt	gaacaacccc	gaccaaggca	acctctaccg	cctgcctgcc	120
	ggttcgggcg	ccgtccgcgc	cagcgatttg	gaaaaacgcc	gcacacccac	cgtccaacag	180
30	cctgccgatg	ccgaagtatt	gaaaagcgtc	aaaggtgtcc	gcctcgagcg	cgacggcagc	240
	caacgctggc	tcgttgtcga	cggcaagtct	cctgccgaaa	tctggccgct	cctgaaagcc	300
	ttttggcagg	aaaacggctt	cgacatcaaa	tccgaagaac	ccgccatcgg	acaaaaggaa	360
	accgagtggg	cggaaaaccg	cgccaaaatc	ccccaaagaca	gcttgcgccg	cctcttcgac	420
	aaagtcggct	tggggcgcat	ctactccacc	ggcgagcgcg	acaaattcat	cgtccgtatc	480
	gaacagggca	aaaacggcgt	ttccgacatc	ttcttcgccc	acaaagccat	gaaagaagtg	540
35	tacggcgcca	aagacaaaga	cacgaccgta	tggcagccct	ccccgtccga	tcccaacctc	600
	gaagccgctt	tcctgacgcg	ctttatgcaa	tatttgggcg	ttgacggaca	gcaggcggaa	660
	aacgcatcgg	caaaaaaacc	tacccttccc	gccgccaaacg	aaatggcgcg	tatcgaaagc	720
	aaaagcctga	ttgtcttttg	cgactacggc	agaaactggc	ggcgacacgt	gctcgccctc	780
	gaccgcatcg	ggctgaccgt	cgtcgggtcaa	aacaccgaac	gccacgcctt	cctgggtcaa	840
40	aaagccccga	acgaaagcaa	tgcagttacc	gaacaaaaaac	ccggcctgtt	caaacgcctg	900
	ctgggcaaaag	gcaaagcgga	gaaacctgcc	gaacagccgg	aactgattgt	ctatgcagaa	960
	cctgtcgcca	acgcctcgcg	catcgtcctg	ctcaacaaag	acggcagcgc	atatgccggc	1020
	aaagacgcat	ccgcattatt	gggcaaaactc	cattccga			1058
45	<210> 7						
	<211> 1058						
	<212> ADN						
	<213> Neisseria meningitidis						
50	<400> 7						
	ggcagcaaaa	ccgaacagcc	caagctcgac	taccaaaagcc	ggtcgcaccg	cctgatcaaa	60
	cttgaagtcc	cacctgattt	gaacaacccc	gaccaaggca	acctctaccg	cctgcctgcc	120
	ggttcgggcg	ccgtccgcgc	cagcaatttg	gaaaaacgcc	gcacacccac	cgtccaacag	180
55	cctgccgatg	ccgaagtatt	gaaaagcgtc	aaaggtgtcc	gcctcgagcg	cgacggcagc	240
	caacgctggc	tcgttgtcga	cggcaagtct	cctgccgaaa	tctggccgct	cctgaaagcc	300

```

      ttttggcagg aaaacggctt cgacatcaaa tccgaagaac ccgccatcgg acaaaaggaa 360
      accgagtggg cggaaaaccg cgccaaaatc cccaagaca gcttgcgccg cctcttogac 420
      aaagtcggct tgggcggcat ctactccacc ggcgagcgcg acaaattcat cgtccgtatc 480
      gaacagggca aaaacggcgt ttccgacatc ttcttcgccc acaaagccat gaaagaagtg 540
5      tacggcggca aagacaaaga cacgacgta tggcagccct ccccgccga tcccaacctc 600
      gaagccgctt tcctgacgag ctttatgcaa tatttgggag ttgacggaca gcaggcggaa 660
      aacgcacgag caaaaaaacc tacccttccc gccgccaacg aaatggcgcg tatcgaaagc 720
      aaaagcctga ttgtctttgg cgactacggc agaaactggc ggcgcaccgt gctcgccctc 780
      gaccgcatcg ggctgaccgt cgtcgggtcaa aacaccgaac gccacgcctt cctgggtcaa 840
10      aaagccccga acgaaagcaa tgcagttacc gaacaaaaac ccggcctgtt caaacgcctg 900
      ctggggcaaag gcaaaagcga gaaacctgcc gaacagccgg aactgattgt ctatgcagaa 960
      cctgtcgcca acgctgcgag catcgtcctg ctcaacaaag acggcagcgc atatgccggc 1020
      aaagacgcat ccgcattatt gggcaaaact cattccga 1058

```

15

<210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia nucleotídica del oligonucleotido sintético 1573

20

<400> 8

ttccatggta gataaaagaa tggctttag

29

25

<210> 9

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia nucleotídica del oligonucleotido sintético 6795

30

<400> 9

aactgcaggc ttgtaaaccg tttgtg

27

35

REIVINDICACIONES.**PROTEÍNA NMB0928 Y SU USO EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS.**

- 5 1. Proteína de *N. meningitidis* denominada NMB0928 caracterizada por ser un antígeno capaz de generar en el organismo receptor una respuesta protectora contra infecciones causadas por bacterias del género *Neisseria* y tener la secuencia aminoacídica identificada en el listado de secuencias como Secuencia 4.
- 10 2. Proteína denominada NMB0928, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por estar codificada por el gen NMB0928 identificado en el listado de secuencias como Secuencia 3.
- 15 3. Gen NMB0928 de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por tener la secuencia de bases identificada en el listado de secuencias como Secuencia 3 y codificar para la proteína de la reivindicación 1.
- 20 4. Proteína o péptido obtenido por vía recombinante o por síntesis química caracterizada porque tiene la secuencia de la proteína NMB0928 y ser capaz de generar en el organismo receptor una respuesta protectora contra infecciones causadas por bacterias del género *Neisseria* de acuerdo con la reivindicación 1.
- 25 5. Formulación farmacéutica caracterizada porque contiene la proteína o el péptido de las reivindicaciones 1, 2 y 4, o la proteína de la reivindicación 1 producida de manera natural. de acuerdo con la reivindicaciones 1, 2 y 4.
- 30 6. Formulación farmacéutica de la reivindicación 5 caracterizada porque es una vacuna capaz de generar en el organismo receptor una respuesta protectora contra infecciones causadas por bacterias del género *Neisseria*.
7. Formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6 caracterizada porque es una vacuna capaz de generar en el organismo receptor

una respuesta protectora contra infecciones causadas por *Neisseria meningitidis*.

- 5 8. Formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6
caracterizada porque es una vacuna capaz de generar en el organismo receptor
una respuesta protectora contra infecciones causadas por *Neisseria gonorrhoeae*.
- 10 9. Formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8,
caracterizada por ser una formulación profiláctica o terapéutica.
- 15 10. Formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8,
caracterizada porque es una formulación combinada conteniendo uno o varios
antígenos de naturaleza antigénica diferente, obtenidos por vía recombinante,
por vía sintética o producidos de manera natural.
11. Formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8,
caracterizada porque contiene antígenos polisacáridicos.
- 20 12. Formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8 y 9,
caracterizada porque uno de los componentes de la formulación es un
polisacárido capsular de *N. meningitidis*.
- 25 13. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada
porque contiene un conjugado proteína-polisacárido, cuya porción
polisacáridica se corresponde con un polisacárido bacteriano.
14. Formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8,
caracterizada porque contiene uno o varios microorganismos inactivados.
- 30 15. Formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8,
caracterizada porque contiene antígenos peptídicos.

16. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6, caracterizada porque contiene hormonas.
- 5 17. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6, caracterizada porque contiene factores de crecimiento.
- 10 18. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 17 caracterizada porque es una formulaci3n para ser administrada por v1a parenteral.
- 15 19. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 17 caracterizada porque es una formulaci3n para ser administrada por v1a mucosal.
- 20 20. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 17 caracterizada porque es una formulaci3n para ser administrada por v1a oral.
21. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 20 caracterizada por ser una formulaci3n inmunoestimulante o inmunopotenciadora.
- 25 22. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 21 caracterizada porque contiene p3ptidos o fragmentos del ant1geno NMB0928.
- 30 23. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 21 caracterizada porque contiene mimotopos del ant1geno NMB0928.
24. Organismo gen3ticamente modificado caracterizado porque contiene el gen de la reivindicaci3n 3, o parte de este, solo o formando parte de otra secuencia g3nica.

25. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con la reivindicaci3n 24 caracterizada porque contenga el organismo gen3ticamente modificado vivo, atenuado o un preparado de este.
- 5 26. Formulaci3n farmac3utica caracterizada porque contiene la prote3na expresada por el organismo de la reivindicaci3n 24, y es capaz de generar en el organismo receptor una respuesta protectora contra infecciones causadas por bacterias del g3nero Neisseria.
- 10 27. Formulaci3n farmac3utica caracterizada porque contiene la prote3na o el p3ptido de las reivindicaciones 1, 2 y 4, como portadora de ant3genos de diversa naturaleza.
- 15 28. Componente farmac3utico caracterizado porque contiene la prote3na NMB0928 de las reivindicaciones 1 y 2, o fragmentos de esta y es capaz de permitir la detecci3n, solo o de conjunto con otros componentes, la enfermedad meningoc3ccica en humanos.
- 20 29. Componente farmac3utico caracterizado porque contiene el gen de la reivindicaci3n 3, o fragmentos de este y es capaz de permitir la detecci3n, solo o de conjunto con otros componentes, la enfermedad meningoc3ccica en humanos.
- 25 30. Uso de la prote3na NMB0928 o fragmentos de esta, de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en biosensores u otras aplicaciones farmac3uticas o biotecnol3gicas.
31. Uso del gen NMB0928, de acuerdo con la reivindicaci3n 3, o fragmentos de este, en biosensores u otras aplicaciones farmac3uticas o biotecnol3gicas.

Figura 1

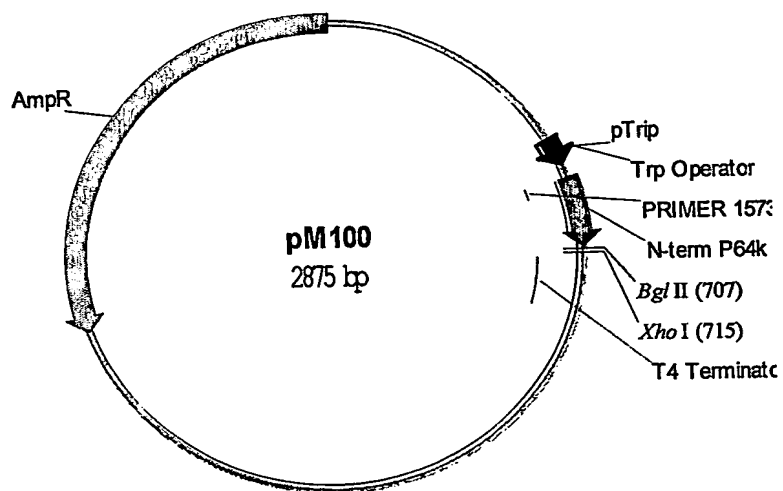


Figura 2

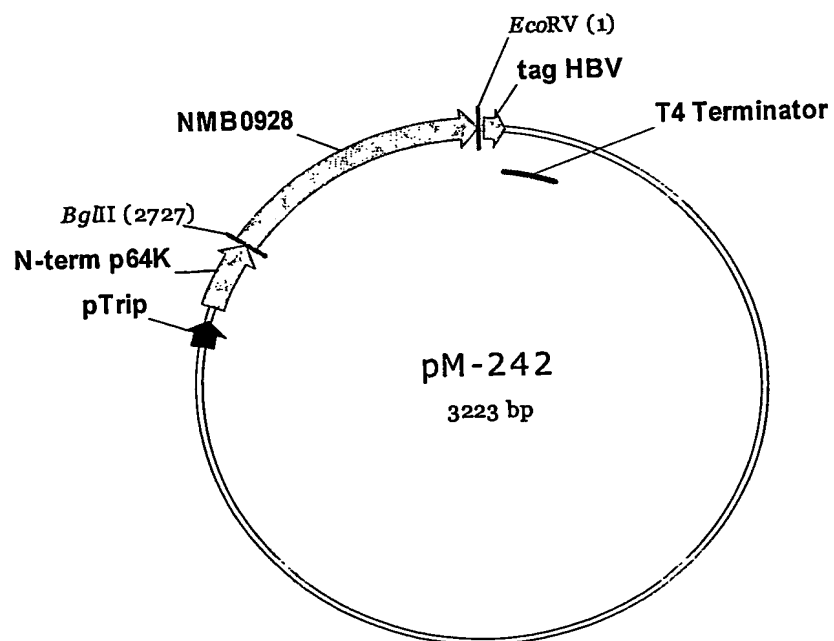
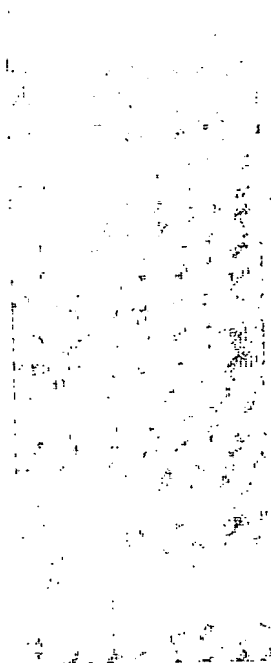


Figura 3

1

2



NMB0928



Figura 4

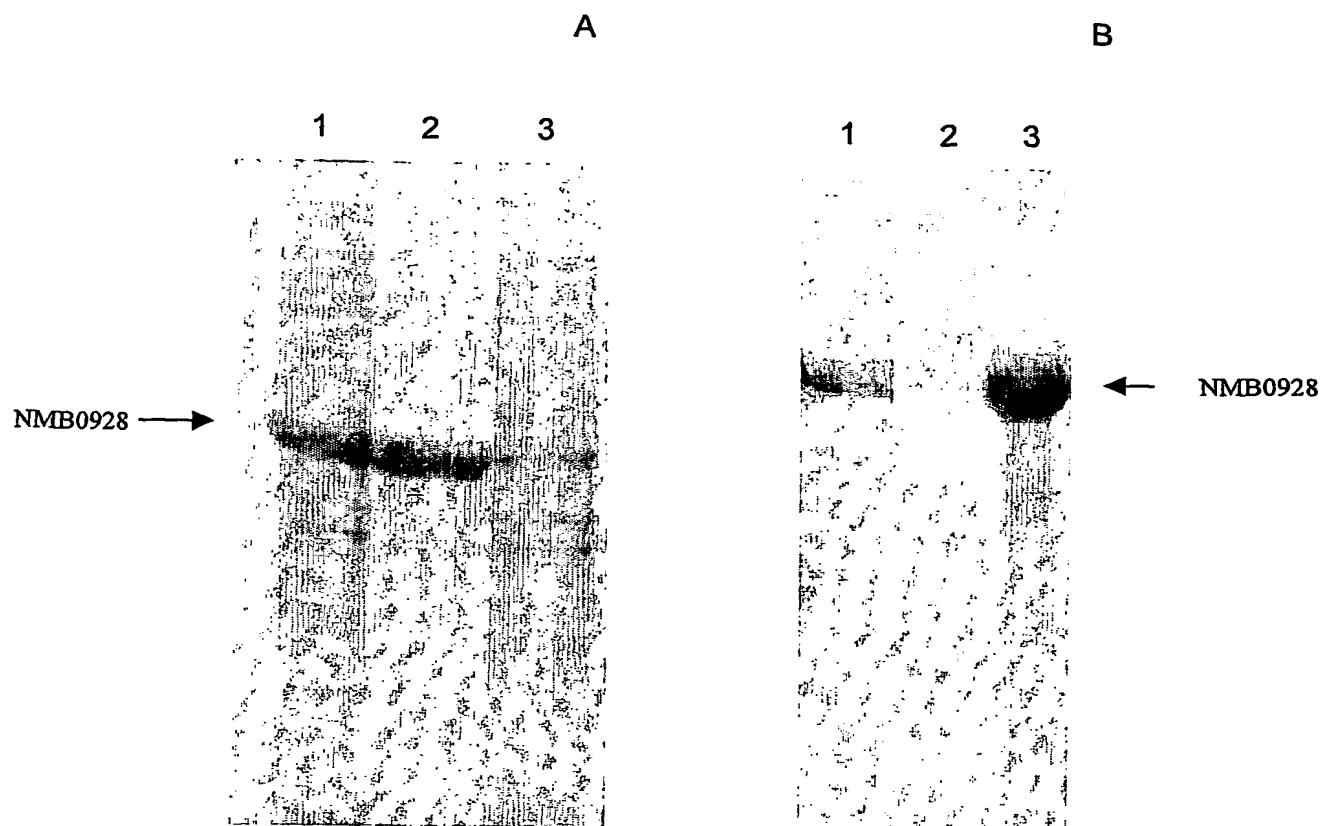


Figura 5

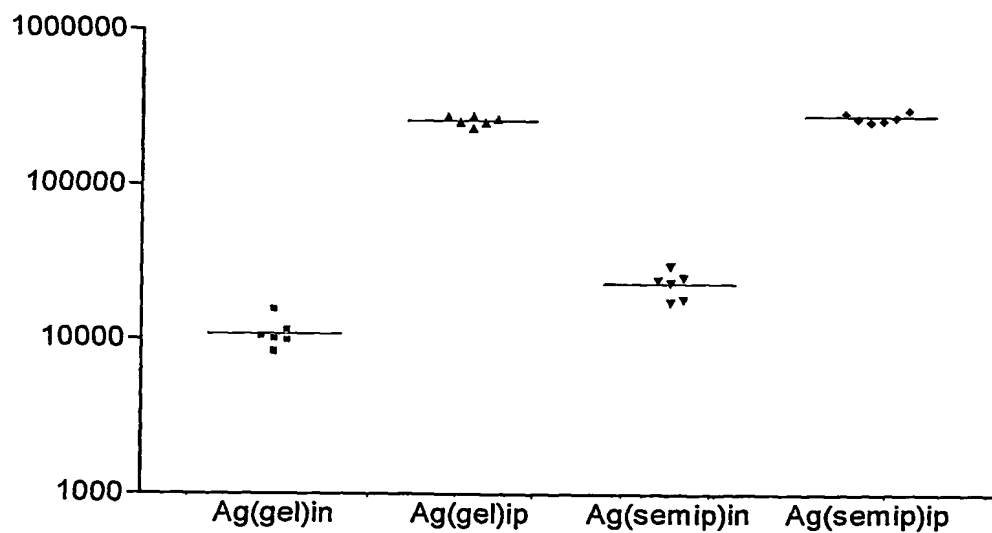


Figura 6

1 2



← **NMB0928**

Figura 7

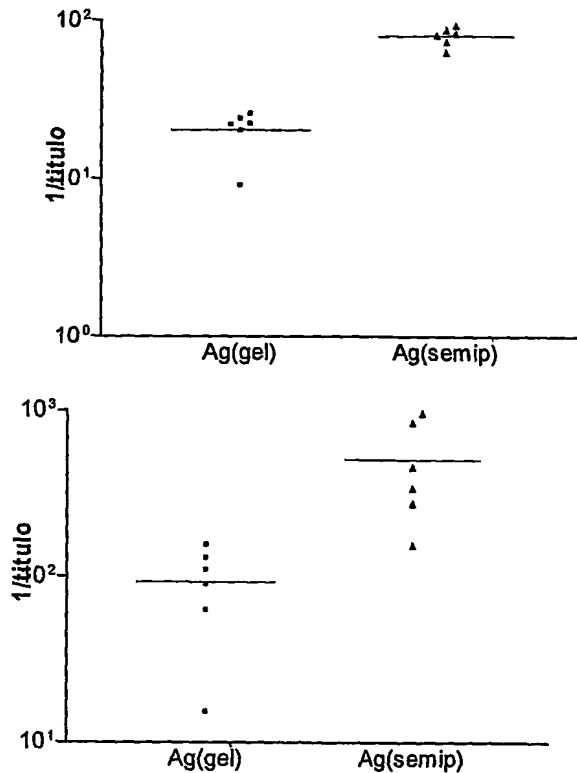


Figura 8

Neisseria meningitidis serogrupo C
 >Neisseria meningitidis FAM18:orf94 108496 109923 PIR:C81141
 hypothetical protein NMB0928 [imported] - Neisseria
 meningitidis (group B strain MD58)
 Length = 1428

Score = 1939 bits (978), Expect = 0.0
 Identities = 1038/1058 (98%)
 Strand = Plus / Plus

```

Query: 2   ggcagcaaaacgaacagcccaagctcgactaccaaagccggtcgaccgcctgatcaaa 61
           |||
Sbjct: 364 ggcagcaaaacgaacagcccaagctcgactaccaaagccggtcgaccgcctgatcaaa 423

Query: 62   cttgaagtcccaacctgatttgaacaaccccgaccaaggcaacctctaccgcctgcctgcc 121
           |||
Sbjct: 424   ctcgaagtcccaacctgatttgaacaaccccgaccaaggcaacctctaccgcctgcctgcc 483
  
```

Query: 122 ggttcggggcgccgtccgcgccagcaatttgaaaaacgcgcacacccaccgtccaacag 181
 |||||
 Sbjct: 484 ggttcggggcgccgtccgcgccagcgatttgaaaaacgcgcacacccgcgcgtccaacag 543

Query: 182 cctgccgatgccgaagtattgaaaagcgtcaaaagggtgtccgcctcgagcgcgcacggcagc 241
 |||||
 Sbjct: 544 cctgccgatgccgaagtattgaaaagcgtcaaaagggtgtccgcctcgagcgcgcacggcagc 603

Query: 242 caacgctgggtcgttgtcgacggcgaagtctcctgccgaaatctggcgcgtcctgaaagcc 301
 |||||
 Sbjct: 604 caacgctgggtcgttgtcgacggcgaagtctcctgccgaaatctggcgcgtcctgaaagcc 663

Query: 302 ttttggcaggaaaacgggttcgacatcaaataccgaagaacccgccatcggaacaaaggaa 361
 |||||
 Sbjct: 664 ttttggcaggaaaacgggttcgacatcaaataccgaagaacccgccatcggaacaaaggaa 723

Query: 362 accgagtgggcggaacacgcgcgaatacccccaagacagcttgccgcgcctcttcgac 421
 |||||
 Sbjct: 724 accgagtgggcggaacacgcgtgccaaatacccccaagacagcttgccgcgcctatttcgac 783

Query: 422 aaagtcgggttgggcgcatctactccacggcgagcgcgcacaaattcatcgccgtatc 481
 |||||
 Sbjct: 784 acagtcgggttgggcgcatctactccacggcgagcgcgcacaaattcatcgccgtatc 843

Query: 482 gaacagggcaaaaacgcggtttccgacatcttcttcgccacaaagccatgaaagaagtg 541
 |||||
 Sbjct: 844 gaacagggcaaaaacgcggtttccgacatcttcttcgccacaaagccatgaaagaagtg 903

Query: 542 tacggcggcgaagacaaagacacgacgcgtatggcagccctcccgctccgatcccaacctc 601
 |||||
 Sbjct: 904 tacggcggcgaagacaaagacacgacgcgtatggcagccctcccgctccgatcccaacctc 963

Query: 602 gaagccgctttcctgacgcgctttatgcaatatttgggcgttgacggacagcagggcgga 661
 |||||
 Sbjct: 964 gaagccgctttcctgacgcgctttatgcaatatttgggcgttgacggacagcagggcgga 1023

Query: 662 aacgcacggcgaacaaacacctaaccctcccgccgccaacgaaatggcgcggtatcgaaagc 721
 |||||
 Sbjct: 1024 aacgcacggcgaacaaacacctaaccctcccgccgccaacgaaatggcgcggtatcgaaagc 1083

Query: 722 aaaagcctgattgtctttggcgactacggcagaaactggcggcgcacccgtgctgcctc 781
 |||||
 Sbjct: 1084 aaaagcctgattgtctttggcgactacggcagaaactggcggcgcacccgtgctgcctc 1143

Query: 782 gaccgcacggggtgacgcgtcgtcggtcaaaacaccgaacgcacgccttcctgggtcaa 841
 |||||
 Sbjct: 1144 gaccgcacggggtgacgcgtcgtcggtcaaaacaccgaacgcacgccttcctgggtcaa 1203

Query: 842 aaagccccgaacgaagcaatgcagttaccgaacaaaacccggcctgttcaaacgcctg 901
 |||||
 Sbjct: 1204 aaagccccgaacgaagcaatgcagttaccgaacaaaacccggcctgttcaaacgcctg 1263

Query: 902 ctgggcgaaggcgaagcggagaaacctgccgaacagccggaactgattgtctatgcagaa 961
 |||||
 Sbjct: 1264 ctgggcgaaggcgaagcggagaaacctgccgaacagccggaactgattgtctatgcagaa 1323

Neisseria meningitidis serogrupo B
 >NmeningitidisMC58:gi_7226166_944053_942857_hypothetical_protein
 Length = 1197

```

Query: 2      ggcagcaaaacggaacagcccaagctcgactaccaaaagccggtcgcacgcgctgatcaaa 61
             |||
Sbjct: 130    ggcagcaaaacggaacagcccaagctcgactaccaaaagccggtcgcacgcgctgatcaaa 189

Query: 62     cttgaagtcccacctgatttgaacaaccccgaccaaggcaacctctacgcgcctgctgcc 121
             |||
Sbjct: 190    cttgaagtcccacctgatttgaacaaccccgaccaaggcaacctctacgcgcctgctgcc 249

Query: 122     ggttcggggcgccgctccgcgccagcaatttgaaaaaacgcgcacacccaccgtccaacag 181
             |||
Sbjct: 250    ggttcggggcgccgctccgcgccagcgatttgaaaaaacgcgcacacccaccgtccaacag 309

Query: 182     cctgccgatgccgaagtattgaaaagcgtcaaagggtgtccgcctcgagcgcgacggcagc 241
             |||
Sbjct: 310    cctgccgatgccgaagtattgaaaagcgtcaaagggtgtccgcctcgagcgcgacggcagc 369

Query: 242     caacgcgtggctcgttgtcgacggcaagtctcctgccgaaatctggccgctcctgaaagcc 301

```

```

|||||
Sbjct: 370 caacgctggctcgttgtcgacggcaagtctcctgccgaaatctggccgctcctgaaagcc 429

Query: 302 ttttggcaggaaaaacggcttgcacatcaaatccgaagaacccgccatcggacaaaaggaa 361
|||||
Sbjct: 430 ttttggcaggaaaaacggcttgcacatcaaatccgaagaacccgccatcggacaaaaggaa 489

Query: 362 accgagtggcggaacccgcgcaaaatccccaagacagcttgccgcgcctcttcgac 421
|||||
Sbjct: 490 accgagtggcggaacccgcgcaaaatccccaagacagcttgccgcgcctcttcgac 549

Query: 422 aaagtgcggttggcgccatctactccacggcgagcgacaaaattcatcgctccgtatc 481
|||||
Sbjct: 550 aaagtgcggttggcgccatctactccacggcgagcgacaaaattcatcgctccgtatc 609

Query: 482 gaacagggcaaaaacggcgtttccgacatcttcttcgccacaaaagccatgaaagaagtg 541
|||||
Sbjct: 610 gaacagggcaaaaacggcgtttccgacatcttcttcgccacaaaagccatgaaagaagtg 669

Query: 542 tacggcggcgaagacaaagacacgacgtatggcagccctcccgctccgatcccaacctc 601
|||||
Sbjct: 670 tacggcggcgaagacaaagacacgacgtatggcagccctcccgctccgatcccaacctc 729

Query: 602 gaagccgctttcctgacgcgctttatgcaatatttgggcgttgacggacagcaggcgga 661
|||||
Sbjct: 730 gaagccgctttcctgacgcgctttatgcaatatttgggcgttgacggacagcaggcgga 789

Query: 662 aacgcacatggcgaacccctacccttcccgccgccaacgaaatggcgcgatcgaaagc 721
|||||
Sbjct: 790 aacgcacatggcgaacccctacccttcccgccgccaacgaaatggcgcgatcgaaagc 849

Query: 722 aaaagcctgattgtcttttggcgactacggcagaaaactggcgcgacacgtgctcgccctc 781
|||||
Sbjct: 850 aaaagcctgattgtcttttggcgactacggcagaaaactggcgcgacacgtgctcgccctc 909

Query: 782 gaccgcacatgggctgaccgtcgtcggtcaaaacacccaacgacccacgcttctctgggtcaa 841
|||||
Sbjct: 910 gaccgcacatgggctgaccgtcgtcggtcaaaacacccaacgacccacgcttctctgggtcaa 969

Query: 842 aaagccccgaacgaaagcaatgcagttaccgaacaaaaacccggcctgttcaaacgcctg 901
|||||
Sbjct: 970 aaagccccgaacgaaagcaatgcagttaccgaacaaaaacccggcctgttcaaacgcctg 1029

Query: 902 ctgggcaaaaggcaaaagcggagaaacctgccgaacagccggaactgattgtctatgcagaa 961
|||||
Sbjct: 1030 ctgggcaaaaggcaaaagcggagaaacctgccgaacagccggaactgattgtctatgcagaa 1089

Query: 962 cctgtcgccaacgcgtcgcgcatcgctcgtcacaacaaagacggcagcgcatatgccggc 1021
|||||
Sbjct: 1090 cctgtcgccaacgcgtcgcgcatcgctcgtcacaacaaagacggcagcgcatatgccggc 1149

Query: 1022 aaagacgcatccgcattattgggcaaaactccattccga 1059
|||||
Sbjct: 1150 aaagacgcatccgcattattgggcaaaactccattccga 1187

```

Neisseria gonorrhoeae

>Neisseria gonorrhoeae FA1090:orf928 922099 923526 PIR:C81141
hypothetical protein NMB0928 [imported] - Neisseria

meningitidis (group B strain MD58)
Length = 1428

Score = 1685 bits (850), Expect = 0.0
Identities = 1006/1058 (95%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 2      ggcagcaaaacggaacagcccaagctcgactaccaagccggtcgccaccgctgatcaaa 61
              |||
Sbjct: 364    ggcagcaaaacggaacagcccaagctcgactaccaagccggtcgccaccgctgatcaaa 423

Query: 62     cttgaagtccacctgatttgaacaaccccgaccaaggcaacctctaccgctgcctgcc 121
              || |||
Sbjct: 424    ctggaagtcccgctgatttgaacaaccccgaccaaggcaacctctaccgctgcctgcc 483

Query: 122     gggtcggggcgccgtccgcgcccagcaatttgaaaaacgcccacacccacggtccaacag 181
              |||
Sbjct: 484    gggtcggggcgccgtccgcgcccagcaatttgaaaaacgcccacacccgctccaacag 543

Query: 182     cctgccgatgccgaagtattgaaaagcgtaaaagggtgtccgcctcgagcgcgacggcagc 241
              |||
Sbjct: 544    ccagccgatgccgaagtattgaaaagcgtaaaagggtgtccgcctcgagcgcgacggcagc 603

Query: 242     caacgctgggtcgttgtcgacggcaagtctcctgccgaaatctggccgctcctgaaagcc 301
              |||
Sbjct: 604    caacgctgggtcgttgtcgacggcaaatcccccgccgaaatctggccgctcctgaaagcc 663

Query: 302     ttttggcaggaaaacggttcgacatcaaatccgaagaacccgccatcggaacaaaggaa 361
              |||
Sbjct: 664     ttttggcaggaaaacggttcgacatcgaatccgaagaacccgccatcggaacaaaggaa 723

Query: 362     accgagtgggcggaacacggcgccaaaatcccccaagacagcttgccgcgcctcttcgac 421
              |||
Sbjct: 724     accgagtgggcggaacacggcgccaaaatcccccaagacagcttgccgcgcctatttcgac 783

Query: 422     aaagtcgggttggggcgcatctactccacggcgagcgcgacaaattcatcgctccgtatc 481
              || |||
Sbjct: 784     acagtcgggttggggcgcatctactccacggcgagcgcgacaaattcatcgctccgtatc 843

Query: 482     gaacaggggcaaaaacggcggttccgacatcttcttcgcccacaaagccatgaaagaagtg 541
              |||
Sbjct: 844     gaacaggggcaaaaacggcggttccgacatcttcttcgcccacaaagcgatgaaagaagtg 903

Query: 542     tacggcgggcaaaagacaaagacacgacgctatggcagccctcccggtccgatcccaacctc 601
              || |||
Sbjct: 904     tatggcgcaaaaacaaagacacgacccatgtggcagccttcggttcgaccccaacctt 963

Query: 602     gaagccgctttcctgacgcgctttatgcaatatattgggcgttgacggacagcaggcgga 661
              || |||
Sbjct: 964     gaggcgctttcctgacgcgctttatgcaatatattgggcgttgacggacagcaggcgga 1023

Query: 662     aacgcacggaacaaaaaacctacccttcccgccgccaacgaaatggcgcgatcgaaagc 721
              |||
Sbjct: 1024    aacgcattggcaaaaacacgaccccttcccgccgccaacgaaatggcgcgatcgaaagc 1083

Query: 722     aaaagcctgattgtctttggcgactacggcagaaactggcgcgccaccgtgctgcctc 781
              |||
Sbjct: 1084    aaaagcctgattgtctttggcgactacggcagaaactggcgcgccaccgtgctgcctc 1143

```

Query: 782 gaccgcatcgggctgaccgtcgtcgggtcaaaacaccgaacgccacgccttctctgggtcaa 841
|||||
Sbjct: 1144 gaccgcatcgggactgaccgtcgtcgggtcaaaacaccgaacgccacgccttctctgggtcaa 1203

Query: 842 aaagccccgaacgaaagcaatgcagttaccgaacaaaaaccggcctgttcaaacgcctg 901
|||||
Sbjct: 1204 aaagccccgaacgaaagcaatgcagttaccgaacaaaaaccggggctgttcaaacgccta 1263

Query: 902 ctgggcaaaggcaaagcggagaaacctgccgaacagccggaactgattgtctatgcagaa 961
|||||
Sbjct: 1264 ctgggcaaaggcaaagcggagaaacctgccgaacagccggaactgattgtctatgcagag 1323

Query: 962 cctgtcgcgaacgcgtcgcgcacgtcctgtctcaacaagacggcagcgcataatgccggc 1021
|||||
Sbjct: 1324 cctgtcgcgcagcgggtcgcgcacgtcctgtctcaacaagacggcagcgcataatgccggc 1383

Query: 1022 aaagacgcacccgcattattgggcaaaactocattccga 1059
|||||
Sbjct: 1384 aaagacgcacccgcactgttaggcaaaactocattccga 1421

Figura 9

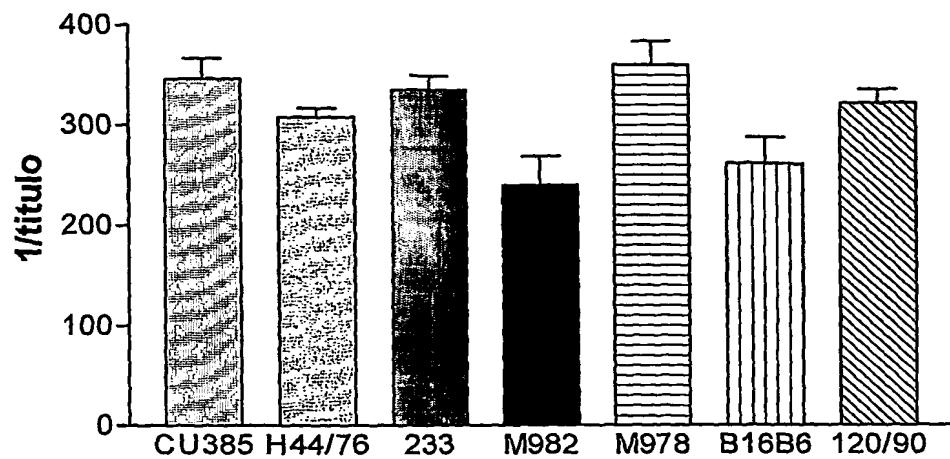


Figura 10

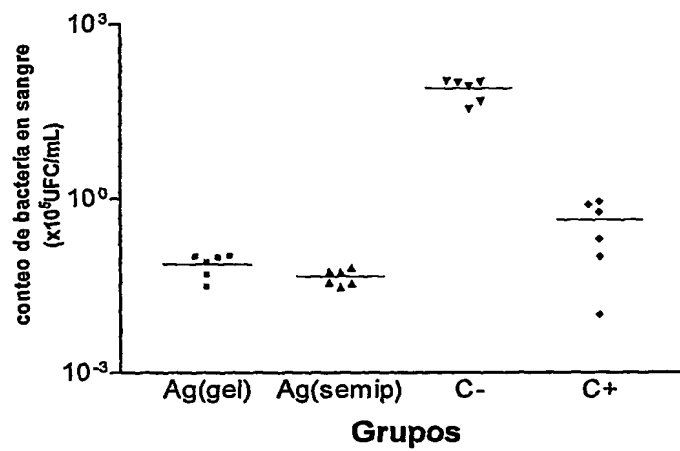


Figura 11

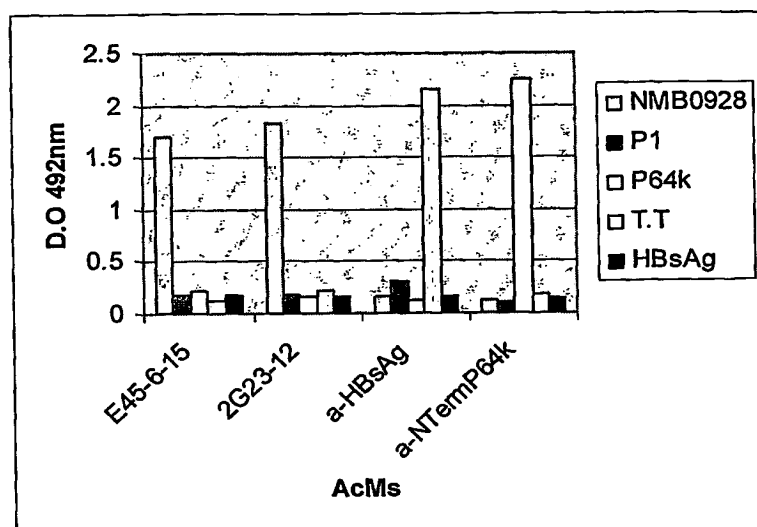
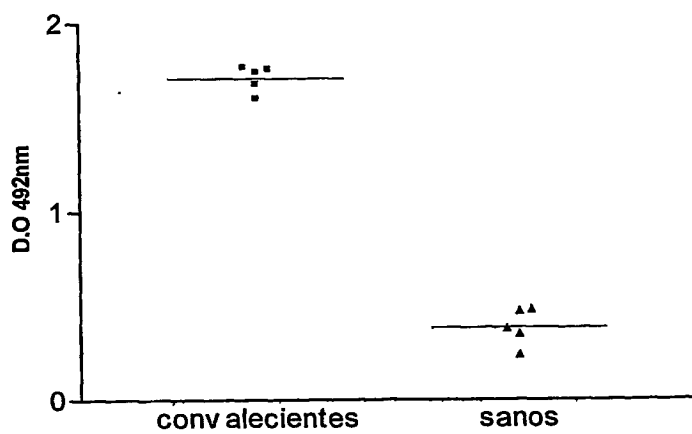
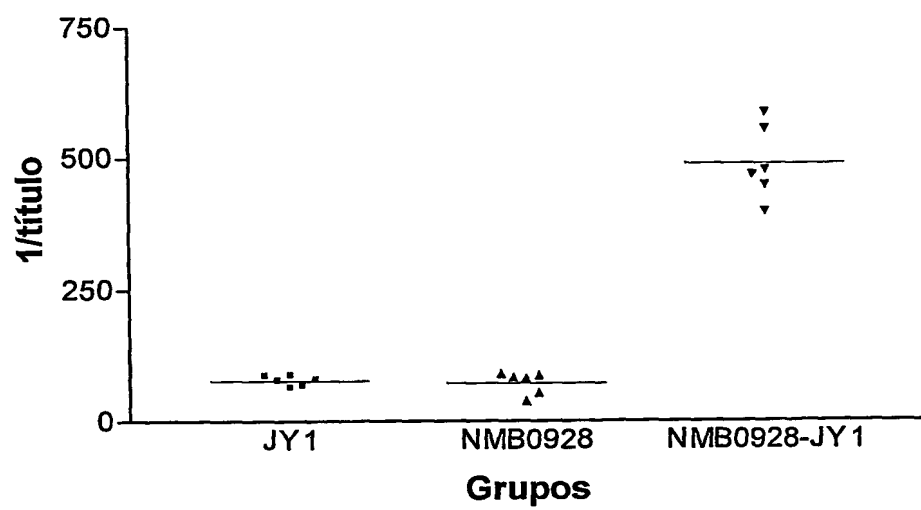


Figura 12



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figura 13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No
PCT/CU2004/000016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/22 A61K39/095 C12N15/31 A61K39/39 A61K48/00
G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/57280 A (CHIRON CORPORATION; THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH; FRASER, CLAIRE) 11 November 1999 (1999-11-11) claims 1-18; sequences 1521,1522	1-31
X	WO 01/37863 A (CHIRON SPA; GIULIANI, MARZIA, MONICA; PIZZA, MARIAGRAZIA; RAPPUOLI, RI) 31 May 2001 (2001-05-31) the whole document	1-31
X	WO 01/31019 A (CHIRON SPA; GALEOTTI, CESIRA; GRANDI, GUIDO; MASIGNANI, VEGA; MORA, MA) 3 May 2001 (2001-05-03) claims 1-13; table 1	22, 28-31

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 May 2005

Date of mailing of the international search report

17/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Groenendijk, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU2004/000016

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 30 and 31 encompass a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern

I Application No

PCT/CU2004/000016

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9957280	A	11-11-1999	AU 761780 B2	12-06-2003
			AU 3967799 A	23-11-1999
			BR 9910089 A	08-06-2004
			CA 2330838 A1	11-11-1999
			CN 1373806 A	09-10-2002
			EP 1093517 A2	25-04-2001
			JP 2004500801 T	15-01-2004
			NZ 508366 A	26-03-2004
			NZ 527182 A	25-06-2004
			RU 2227043 C2	20-04-2004
			WO 9957280 A2	11-11-1999
WO 0137863	A	31-05-2001	AU 1878501 A	04-06-2001
			BR 0015958 A	25-02-2003
			CA 2392880 A1	31-05-2001
			CN 1433322 A	30-07-2003
			CN 1507916 A	30-06-2004
			EP 1235589 A2	04-09-2002
			WO 0137863 A2	31-05-2001
			JP 2003514868 T	22-04-2003
			MX PA02005322 A	06-12-2002
			NZ 519608 A	28-11-2003
			NZ 529213 A	24-03-2005
US 2005074450 A1	07-04-2005			
WO 0131019	A	03-05-2001	AU 1168701 A	08-05-2001
			BR 0015137 A	25-03-2003
			CA 2389321 A1	03-05-2001
			CN 1433470 A	30-07-2003
			EP 1226253 A2	31-07-2002
			WO 0131019 A2	03-05-2001
			JP 2004508801 T	25-03-2004
MX PA02004283 A	17-10-2002			

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2004/000016

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

CIP 7 C07K14/22 A61K39/095 C12N15/31 A61K39/39 A61K48/00
G01N33/569

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 7 C07K A61K C12N G01N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	WO 99/57280 A (CHIRON CORPORATION; THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH; FRASER, CLAIRE) 11 November 1999 (1999-11-11) reivindicaciones 1-18; secuencias 1521,1522	1-31
X	WO 01/37863 A (CHIRON SPA; GIULIANI, MARZIA, MONICA; PIZZA, MARIAGRAZIA; RAPPUOLI, RI) 31 May 2001 (2001-05-31) todo el documento	1-31
X	WO 01/31019 A (CHIRON SPA; GALEOTTI, CESIRA; GRANDI, GUIDO; MASIGNANI, VEGA; MORA, MA) 3 May 2001 (2001-05-03) reivindicaciones 1-13; recuadro 1	22,28-31

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

4 de Mayo de 2005 (04/05/05)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

17 de Mayo de 2005 (17/05/05)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internaci

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Facsímil N°

Funcionario autorizado

Groenendijk, M

Teléfono N°

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2004/000016

Recuadro I Observaciones cuando no han podido efectuarse búsquedas sobre ciertas reivindicaciones (continuación del punto 1 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha establecido respecto de ciertas reivindicaciones, en virtud del Artículo 17.2)a), por las razones siguientes:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
debido a que se refieren a objetos para los que no se ha solicitado a esta Administración su búsqueda, concretamente:
Although claims 30 and 31 encompass a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
debido a que se refieren a partes de la solicitud internacional que no cumplen con las exigencias prescritas, de forma que no puede realizarse una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones Nos.:
debido a que son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con la segunda y tercera frases de la Regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta la unidad de la invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha encontrado invenciones múltiples en esta solicitud internacional, como se indica a continuación:

1. ☐ Debido a que todas las tasas adicionales de búsqueda exigidas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca todas las reivindicaciones para las que puede efectuarse la búsqueda.
2. ☐ Debido a que puede efectuarse la búsqueda respecto de todas las reivindicaciones susceptibles de búsqueda sin esfuerzo que justifique una tasa adicional, esta Administración no invita a pagar ninguna tasa adicional.
3. ☐ Debido a que sólo algunas de las tasas adicionales de búsqueda requeridas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca únicamente las reivindicaciones para las que fueron pagadas las tasas, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó en su momento las tasas adicionales de búsqueda requeridas. En consecuencia, este informe de búsqueda internacional se restringe a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones; abarca las reivindicaciones Nos.:

Observación sobre protesta ☐ Las tasas de búsqueda adicional fueron acompañadas por protesta del solicitante.
☐ Ninguna protesta acompañó al pago de las tasas de búsqueda adicional.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU2004/000016

Documento de patente citado en el informe de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO 9957280	A	11-11-1999	AU	761780 B2	12-06-2003
			AU	3967799 A	23-11-1999
			BR	9910089 A	08-06-2004
			CA	2330838 A1	11-11-1999
			CN	1373806 A	09-10-2002
			EP	1093517 A2	25-04-2001
			JP	2004500801 T	15-01-2004
			NZ	508366 A	26-03-2004
			NZ	527182 A	25-06-2004
			RU	2227043 C2	20-04-2004
			WO	9957280 A2	11-11-1999
WO 0137863	A	31-05-2001	AU	1878501 A	04-06-2001
			BR	0015958 A	25-02-2003
			CA	2392880 A1	31-05-2001
			CN	1433322 A	30-07-2003
			CN	1507916 A	30-06-2004
			EP	1235589 A2	04-09-2002
			WO	0137863 A2	31-05-2001
			JP	2003514868 T	22-04-2003
			MX	PA02005322 A	06-12-2002
			NZ	519608 A	28-11-2003
			NZ	529213 A	24-03-2005
			US	2005074450 A1	07-04-2005
WO 0131019	A	03-05-2001	AU	1168701 A	08-05-2001
			BR	0015137 A	25-03-2003
			CA	2389321 A1	03-05-2001
			CN	1433470 A	30-07-2003
			EP	1226253 A2	31-07-2002
			WO	0131019 A2	03-05-2001
			JP	2004508801 T	25-03-2004
			MX	PA02004283 A	17-10-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.